

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公表

⑪ 公表特許公報(A)

平2-502348

⑫ 公表 平成2年(1990)8月2日

Int. Cl. ¹	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求 予備審査請求 有	部門(区分)	2(1)
B 01 J 13/02					
A 61 K 9/127					
// A 61 K 45/08	C	7624-4C 7624-4C 8829-4C 8317-4C			
		B 01 J 13/02		Z	(全 10 頁)

⑬ 発明の名称 長期保存のための脱水小胞製剤

⑭ 特 願 昭63-502149

⑮ 翻訳文提出日 平1(1989)8月23日

⑯ 出 願 昭63(1988)2月22日

⑰ 国際出願 PCT/US88/00408

⑱ 国際公開番号 WO88/06441

⑲ 国際公開日 昭63(1988)9月7日

優先権主張 ⑳ 1987年2月24日㉑ 米国(US)㉒ 018,190

⑳ 発 明 者 ハウセル、ヘルムート・オトマ スイス国ツュー・バー-8713 ウェリコン、シュバルツバツハ・ス
ール
⑳ 出 願 人 ベスター・インコーポレイテツ アメリカ合衆国 カリフォルニア 91772 サン デイマス クリ
ド
㉑ 代 理 人 弁理士 青 山 孫 外1名
㉒ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), GB(広域
特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

請 求 の 範 囲

1. 分散媒中に保存用添加物を存在せしめたリン脂質小胞製剤の
脱水方法であって、分散媒中に懸濁された小胞の寸法、寸法分布お
よび完全性を實質的に保持したまま、該分散媒を瞬間蒸発させ得る
乾燥操作からなる方法。

2. 乾燥操作が噴霧乾燥、スクレイプ-底面乾燥、または薄膜蒸
発によるものである請求項1に記載の方法。

3. リン脂質小胞が約2000Å以下である請求項1に記載の方
法。

4. リン脂質小胞が単一層膜状である請求項1に記載の方法。

5. リン脂質がホスファチジルコリンおよびホスファチジルセリ
ンからなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

6. ホスファチジルコリンが卵ホスファチジルコリン、1-パル
ミトイル-2-オレオイル-㉓-ホスファチジルコリン、1,2-
パルミトイル-㉓-ホスファチジルコリンおよび1,2-ジオレオ

㉓-ホスファチジルコリンである請求項5に記載の方法。

7. ホスファチジルセリンがジオレオイル-㉓-ホスファチジル
セリン、1,2-ジオレオイル-㉓-グリセロ-3-ホスホーレーセ
リン、および牛脂ホスファチジルセリンである請求項5に記載の
方法。

8. 保存用添加物が炭水化物、二糖類、アルコール類、タンパク
質、アラビアゴム、および単糖類からなる群から選ばれる請求項1
に記載の方法。

9. 炭水化物がデキストラン、単糖または二糖である請求項8に
記載の方法。

10. 二糖類がスクロース、ラクトースおよびトレハロースから
なる群から選ばれる請求項9に記載の方法。

11. 単糖がグルコースである請求項9に記載の方法。

12. 保存用添加物がスクロースである請求項8に記載の方法。

13. スクロースが約5%〜約10%スクロースの量で存在する
請求項12に記載の方法。

14. アルコール類がグリセロール、マンニトール、およびエタレングリコールからなる群から選ばれる請求項8に記載の方法。

15. タンパク質がアルブミンまたはアラビガムである請求項8に記載の方法。

16. リン脂質小胞に治療薬または診断薬が含まれている請求項1に記載の方法。

17. 小胞の再構成の際に治療薬および/または診断薬が組み込まれる請求項1に記載の方法。

18. 治療薬が抗生物質、代謝調節剤、免疫調節剤、化学療法剤および解毒剤からなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

れている。リボソームは、液体空間(腔)を囲っている単一層状または多層層状の脂質小胞である。小胞の壁は、極性頭部および非極性尾部を持った、1またはそれ以上の脂質成分の2分子層で形成されている。水性(または極性)溶液中では、1つの層の極性頭部は外側に向かって配置し、周囲の媒質中に入り込み、脂質の非極性尾部は互いに寄り集まっており、このようにして小胞の壁の中には極性の表面と非極性のコアができる。単一層状のリボソームは、このような1層の2分子層を持っているが、多層層状のリボソームは、一般に、実質的に同心状の複数の2分子層を持っている。

リボソームの製造法は種々知られており、その多くはSzokaおよびPapahadjopoulosにより記述されている[Ann. Rev. Biophys. Biochem., 9: 457-508 (1980)、およびLiposome Technology, Preparation of Liposomes, Vol. I, Gregoriadis (Ed.), CRC Press, Inc. (1984)]。また、数種のリボソーム封入法が特許文献、特にPapahadjopoulosらの米国特許 第4,235,871号(1980年11月25日)、およびSuzukiらの米国特許 第4,018,104号(1977年4月5日)に記載されている。

長期保存のための脱水小胞製剤

発明の分野

本発明は、一般的に言って、保存用添加物の存在下での脱水操作の間の小胞の保存に関するものであり、これにより、小胞の2分子層の完全性が保たれ、凝集や融合が避けられ、従って、この小胞の利用性に何の障害ももたらさない。

本発明の1つの態様は、噴霧乾燥により保存された小胞に向けられている。本発明で使用される小胞には、1層の単一層状の小胞を包含するリン脂質小胞が含まれる。上記の保存された小胞は、再水和により、脱水にかけていない小胞と同じ目的に使用することができる。

発明の背景

リボソームは、広く文献に記載されており、その構造はよく知ら

れている。リボソームを工業上有用なものとするには、リボソーム製剤の保存寿命を延ばすことが望ましい。このような製剤は、製造および出荷が容易であって、かつ種々の温度条件下で中間または末端ユーザが貯蔵できるよう、十分長い保存寿命を持っていなければならない。特に医薬業界においては、封入された薬物が実質的に漏出することなく長期間に渡ってリボソーム製剤を貯蔵し得ることが重要である。

貯蔵時のリボソームの安定性は、通常、与えられた製剤がその元の構造および寸法分布を保持する程度、および該当する場合には、治療薬であれ、診断薬であれ、封入された薬物の封入量によって決められる。例えば、貯蔵する間に、衝突した小胞が融合し、その結果小胞サイズが自然に増大したときに不安定性が生じる。小胞の寸法(サイズ)により、浄化速度や組成分布が決まるので、この大きい小胞は、インビボにおいて非常に異なった運動力学を示すことになる。例えば、大きいリボソームは、小さいものより早く循環系から除去される。さらに、水性リボソーム分散液中のリボソームは凝集

し、沈殿物として沈降することがある。通常、このような沈殿物は再分散することができるが、元の分散液の構造や寸法分布は変わるであろう。最後に、安定性に関する重要な因子は、低分子量の封入物質が貯蔵リボソームから漏出しやすいということである[一般的には、G. Grosoriadis の Liposomes for Drugs and Vaccines, 2 Trends in Biotechnology, 235-241 (1985)を参照]。導入した脂物の含量が少ないとき、および/または外部の水性媒体の量が多いときには、そのような漏出がリボソーム中の脂物の全含量のかなりの割合を占めることもある。

貯蔵時のリボソーム安定性の長期化に関する研究は、凍結乾燥の形態でのリボソーム保存にその焦点が当てられていた。凍結乾燥とは、高真空下で急速に凍結させ、そして脱水することによって物質を乾燥形態に調製する方法を意味している。従来の知見によれば、リン脂質はうまく凍結乾燥されないということであった。デイビス(Davis)のカリフォルニア大学でJohnおよびLois Crossによって行われた最近の研究は、二重膜であるトレハロースが凍結乾燥中に凍結

脂質小胞および製造法、米国特許 第4,397,344号(1982年8月9日); Vanlerbergheら、小球体水性分散液の貯蔵安定性(1981年1月17日)。さらに、凍結乾燥と再水和にかけた脂質小胞体及ぼす、および凍結-解凍にかけたミクロソームおよび卵ホスファチジルコリンSUVに及ぼす糖類の安定化作用も既に知られていた。

凍結乾燥は高価につく方法であり、脱水したリボソーム調製物を工業スケールで製造するためには相当な設備投資を必要とするであろう。噴霧乾燥法およびスクレイブ-表面乾燥(ドラム-乾燥)法は、Bassonが一般的に記載しており[米国特許 第1,349,382号(1970年11月12日)]、工業的に利用するには比較的安全である。さらに、これらの方法は凍結乾燥法が必要とするエネルギーに比べ必要なエネルギーが少ない。薄層蒸発法は噴霧乾燥およびスクレイブ表面乾燥法と等価な方法を構成している。これら3種の方法のそれぞれは、分散媒体の瞬間的な蒸発、または急速な蒸発を引き起こすことができ、この媒体に懸濁させた物質(本発明の場合にはリボソーム)の完全性を損なうことがない。このような蒸発が約60で〜約150での臨

防止物質として機能することを示しており、この研究は、凍結防止物質がリボソームの内外に存在しているときに最善の結果が達成されると結論している。L.M.Croweら [Archives of Biochemistry and Physics 242 (1985)]; J.M.Crowe, L.M.Crowe [Cryobiology, 19, 317 (1982) in Biological Membranes, D.Chapman, Ed.(Academic Press, N.Y. 4, 317)]も参照; これには、センテウなどのある種の生物がトレハロースの存在下で脱水に耐えることができると報告されている。また、Battelle Memorial Institute, Baselは、凍結乾燥中のリボソーム保護物質としてタンパク質および多糖類を使用することを開示しているが、その報告によれば損傷を受けていないリボソーム量は約70%にすぎない。Schneiderら、リボソームのコロイド分散液の脱水方法、米国特許 第4,125,350号(1980年10月11日)。他にもいくつかの特許が発行されているが、これらには凍結乾燥法を用いてリボソームを保存するための種々の方法が開示されている。Evansら、凍結乾燥リボソーム組成物の製造法、米国特許 第4,370,349号(1982年1月25日); Volskyら、貯蔵安定な脂の温度で起こる。

最近になって、単一層膜状の脂質小胞が、膜融合型の過程、例えば膜融合、界面での触媒、エネルギーの伝導および変換、薬物の放出および薬的化などを取り扱ういくつかの研究領域で重要になった。この種の研究が結局は単一層膜状の脂質小胞の工業的応用につながるであろうことが期待される。あらゆる実際の応用において、長期保存の問題およびこれに関連する小胞と2分子層の安定性の問題が重要になる。小さい単一層膜状の脂質小胞(SUV)の水性懸濁液が熱力学的に不安定であることがよく知られている。例えば、両性イオンであるホスファチジルコリン類から調製されたSUVは、室温で凝集するか、または大きい多重層膜状の脂質粒子に融合する傾向にある。さらに、これらは時間とともに化学的な分解を受ける。SUVの融合過程は、SUVが凍結-解凍または脱水にかけられたときに大きく促進される。凍結と解凍によって卵ホスファチジルコリンのSUVが大きい多重層膜構造に逆変換することが示されていた[G.StraussおよびE.Basson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1422 (1

116); この文献の開示は参考のために挙げた。従って、SUVは、種々の添加物の安定化作用を試験するのに、および凍結乾燥またはこれと等価な方法による脱水を試験するのに理想的な系である。

発明の要約

本明細書中で説明する発明は、保存用添加物の存在下、凍結乾燥およびこれと等価な方法によってリン脂質小胞を保存することに関する。

本発明は、分散媒体の時間的な凝乳、または急速な凝乳が可能な乾燥法を意図するものである。凍結乾燥およびその他の等価な方法、例えばスケイプ表面乾燥または薄膜蒸発などを本発明において用いることができる。

図様の1つでは、小さい単一薄層状のリン脂質小胞を、5-10%(0.15-0.3M)スクロースの存在下、凍結乾燥によって保存する。

図面の簡単な説明

第1D図は、10%(0.3M)スクロース含有の凍結液中、1-

DOPS=ジオレオイル- $\alpha\alpha$ -ホスファチジルセリンの一ナトリウム塩

ESR=電子スピン共振

CAT16=4-(N,N-ジメチル-N'-ヘキサデシル)アンモ

ニウム-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-

1-オキシシラノイオグライド

本明細書中で用いる「小胞」は、水性の内室を有する通常は球状のミセルを意味し、2分子層の膜を形成する脂質から得られることが多く、「リボソーム」と呼ばれる。「ミセル」は両親媒性分子の凝集によって得られる粒子を意味する。本発明においては、好ましい両親媒性物質は生物学的脂質である。ミセルは、自然に結合する疎水性部分と親水性部分を備えた分子(いわゆる両親媒性分子)の水溶性の凝集体である。

小胞を形成させる方法はこれまで当分野で極めてよく知られていた。代表的には、リン脂質、例えば1-パルミトイル-2-オレオイル- $\alpha\alpha$ -ホスファチジルコリンから調製されるが、その他の物質、

パルミトイル-2-オレオイル- $\alpha\alpha$ -ホスファチジルコリン(POPC)/ジオレオイル- $\alpha\alpha$ -ホスファチジルセリン-ナトリウム塩(DOPS)がモル比7:3である、超音波処理したリン脂質分散液の代表的な溶解プロフィールを図式的に示すものである。

第1E図は、同じ超音波処理分散液を凍結乾燥にかけた後の溶解プロフィールを図式的に示すものである。

第1F図は、上記2つの溶解プロフィール(DおよびE)を重ね合わせたときの差算プロフィールを図式的に示すものである。

第2図は、超音波処理したPOPC/DOPS(モル比7:3)の混合リン脂質分散液の電子顕微鏡写真を示すものである。

詳細な説明

短縮形および定義

SUV=小さい単一薄層状の小胞

EPC=卵ホスファチジルコリン

POPC=1-パルミトイル-2-オレオイル- $\alpha\alpha$ -ホスファチジルコリン

例えば中性の脂質など、さらに、表面改質剤、例えば陽性または陰性に荷電した化合物などを含んでもよい。本明細書中で用いる「小さい単一薄層状の小胞」とは、その寸法範囲が約2000Å以下である単一の2分子層の球状の殻を有する小胞を意味する。

本発明において保存用添加物として用いるのに適しているのは、種々の脱水化物を含む多数のあらゆる物質であり、特にデキストランおよび他の糖の二重塩、例えばスクロースおよびラクトースなど、アルコール類、例えばグリセロール、マンニトールおよびエタレングリコールなど、タンパク質類、例えば卵アルブミンなど、およびアラビアゴムが含まれる。後記の実施例で用いられているように、スクロースが適当な二糖の代表である。その他の保存用添加物を本発明の範囲内で用いることができることは当業者の理解するところであろう。

本発明の小胞は、E.L.HawkおよびE.C.Gasbleが記載している超音波処理[Anal.Biog., 94, p.201-207 (1979)]によって、または1985年1月31日に出願され、本出願と同じ譲受人に譲渡されたE.Gasble

の同時特許出願(現在米国特許 第4,732,788号)に記載されている方法を用いる微細乳化によって調製された小さい(2000Å以下)単一薄層状のリン脂質小胞の形態であるのが好ましい(同文献は参のために挙げた)。

種々のあらゆる化合物を小胞の水性内室に封入することができる。代表的な治療用薬物には抗生物質、代謝調整剤、免疫調整剤、化学療法剤、解毒剤などが含まれる。同様にして、診断用の放射性核種および蛍光物質またはその他のインビトロおよびインビボ適用で検出可能な物質をこの小胞に供給することもできる。

本発明の好ましい態様では、小胞は、保存用の添加物の存在下で噴霧乾燥機にかけられる小さい単一薄層状のリン脂質小胞である。

本発明は、脱水とその後の再水和の間に小胞を保存するので極めて有用である。「保存」とは、平均の寸法および寸法の分布が影響を受けず、再水和のときに融合または凝集が全く観察されないかまたはわずかに観察されず、小胞の2分子層の完全性が保持され、小胞の利用性に何の障害ももたらさないことを意味する。

シキニウム-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1,3-ジオキソラン-5-イル-1-カルボキシレート(CAT 16)はMolecular Probes(Junction City, Oregon)から購入した。K.Fe(CN)₆はHerc [Darnstadt, F. R.G.]から入手した。³H(G)-ラフィノースはNew England Nuclear[Boston, Massachusetts]の製品であり、イヌリン[C¹⁴]カルボキシレート(Mr=5200)はAmersham International(Amersham U.K.)から入手した。セファデックスG-50およびセファロース4BはPharmacia Fine Chemicals AB(Zurich, Switzerland)から購入した。

方法

小胞の調製

超音波処理したリン脂質分散液は以前に記載されているようにして調製した[Braunerら: Journal of Biological Chemistry, Vol. 232, p. 7538 (1958)]。簡単に説明すると、リン脂質(例えばPOPCおよびDOPS、モル比7:3)(250mg)を容量によりCAT 16(1.7mg)とともにCHCl₃/CH₃OH(2:1 容量/容量)(10ml)に溶解し、このリン脂質の有機溶媒溶液を回転蒸発により乾

原料および方法

原料

ジオレイル-ホスファチジルセリン[1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン(DOPS)]は、Barnettら[Chemistry and Physics of Lipids, Vol. 30, p. 35 (1982)]に従って合成したか、またはCibaigy(Basel, Switzerland)から供給を受けた。1-パルミトイル-2-オレイル-sn-ホスファチジルコリン(POPC)、1,2-パルミトイル-sn-ホスファチジルコリン、1,2-ジオレイル-sn-ホスファチジルコリンは、すべてPallanら[Biochimica Biophysica Acta Vol. 240, p. 539 (1971)]に従って合成した。ホスファチジルコリンおよび牛脳ホスファチジルセリンはLipid Products(Surray, U.K.)から購入した。使用したリン脂質はTLCで測定して99%純度であった。スクロース、トレハロースおよびグルコースはSigma Chemical Company (St. Louis, Mo.)から入手した。アスコルビン酸はFluka (Buchs, Switzerland)から入手した。4-(N,N-ジメチル-N-ヘキサデシル)ア

ミドールは、このフィルムを高真空下(<10⁻⁴ torr)で乾燥し、この乾燥リン脂質フィルムを5~10%(0.15~0.3M; 通常は10%スクロースを使用)スクロース含有の10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に懸濁させることによってリン脂質分散液を調製した。他に記載がなければリン脂質濃度は50mg/mlであり、リン脂質とスピニング液(CAT 16)のモル比は100:1であった。この分散液(5ml)を、標準マイクロチップを備えたBranson B11ソニケーターを用いて超音波処理にかけた。N₂雰囲気中、平面圧のガラス製容器において50分間、超音波処理を行った。この試料管を氷水中に浸漬し、ソニケーターをパルスモードで用いた(50%効率のサイクル; 即ち、80秒間の超音波処理と冷却を交互に行った)。超音波処理の後、試料を5000rpmで10分間遠心し、ソニケーターのチップから放出されたT₁を除いた。この超音波処理したリン脂質分散液を緩衝液で希釈し、全容量を50mlにした(希釈係数=10)。この希釈の超音波処理分散液(4.5ml)を、後記のようにBuchi噴霧乾燥機を用いて噴霧乾燥した。超音波処理によって

生成した小さい単一層状の小胞(SUV)の水性内室に封入させようとするあらゆる化合物(物質)を、乾燥リン脂質フィルムを分散させるのに用いた10 mMリン酸緩衝液(pH 7)に加えた。こうして、 $K_2Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O$ 、 3H -ラフィノースおよび ^{14}C -イヌリン カルボン酸を封入した。外部の $K_2Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O$ -ラフィノースまたは ^{14}C -イヌリン カルボン酸は、セファデックスG-50(凝集)のゲル濾過によりSUVから除去した(カラムの寸法 19 cm x 2.5 cm)。ゲル濾過の条件としては、80 mg/mlのリン脂質分散液(3 ml)を適用し、分画収集器で溶出液を集め、分画あたりに15滴=0.9 mlを集め、溶出速度は75 ml/時であった。この溶出液をリン酸塩に対して分析した。リン脂質含有の分画を集め、50 mlに希釈した。この希釈したリン脂質分散液(4.5 ml)をBuchi噴霧乾燥機で噴霧乾燥した(下記を参照)。

方法

噴霧乾燥

Buchiの噴霧乾燥機(Buchi Laboratory-Techniques, Flawil, Swi

a. Vol. 738, p. 470 (1984))からの詳細な記述のようにして行った。

セファロース4B樹脂の目盛付けもこの参考文献に記載されている。

膜厚性の光散乱

アルゴンイオンレーザー(Spectra Physics; モデル171; $\lambda = 514.5$ nm)、電圧コントロールした散乱セルホルダー、デジタル目盛修正器[Halvern I 1022; 96 チャンネル]、およびオンラインのNova 3 コンピューター[Baller, E.L., Dissertation 5504, ETH Zurich]からなる自家製の装置でリン脂質小胞の寸法を測定した。

凍結破壊電子顕微鏡

Bauerら[Biochemistry 22: 4775 (1983)]および本明細書中に引用した参考文献(これらの開示は参考のために本明細書中に示した)の記載のようにして、凍結破壊電子顕微鏡用のリン脂質分散液試料を凍結固定し、破壊し、そして複製した。

ESR測定

2分子層の完全性および脂質の性質をモニターするために、先の刊行物[Strauss and Hauser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 82, p.

1522 (1985); 参考のために示した]に記載されている電子スピン共振試験を用いた。スピン標識CAT16を、脂質と標識のモル比 ~100:1としてリン脂質2分子層に加えた。このスピン標識の遊離ラジカルは2分子層の極性基の領域に配置される。SUVからなる超音波処理の分散液においては、この標識は2分子層の外側および内側層の間にランダムに分配される。即ち、約65~70%の標識は外側の2分子層表面に配置され、その残りは内部の2分子層表面に存在する。リン脂質分散液を0℃まで冷却し、30 mMのアスコルビン酸ナトリウムを加えた。アスコルビン酸ナトリウムは、0℃ではリン脂質2分子層を透過できない還元剤であり、外側の2分子層表面に位置しているスピン標識と相互作用するであろう。結果として65~70%のスピン標識が失活する。残りの「内側の」ESRシグナルの損失は、無傷の膜では全シグナルの~1/3であるが、この損失が2分子層がアスコルビン酸塩に対して permeable になったことの指標となる。

リン脂質分散液の目盛付きセファロース4Bカラムによるゲル濾過

超音波処理したリン脂質分散液(主としてSUVからなる)のゲル濾過は、SchurtenbergerおよびHauser[Biochimica Biophysica Acta

1522 (1985); 参考のために示した]に記載されている電子スピン共振試験を用いた。スピン標識CAT16を、脂質と標識のモル比 ~100:1としてリン脂質2分子層に加えた。このスピン標識の遊離ラジカルは2分子層の極性基の領域に配置される。SUVからなる超音波処理の分散液においては、この標識は2分子層の外側および内側層の間にランダムに分配される。即ち、約65~70%の標識は外側の2分子層表面に配置され、その残りは内部の2分子層表面に存在する。リン脂質分散液を0℃まで冷却し、30 mMのアスコルビン酸ナトリウムを加えた。アスコルビン酸ナトリウムは、0℃ではリン脂質2分子層を透過できない還元剤であり、外側の2分子層表面に位置しているスピン標識と相互作用するであろう。結果として65~70%のスピン標識が失活する。残りの「内側の」ESRシグナルの損失は、無傷の膜では全シグナルの~1/3であるが、この損失が2分子層がアスコルビン酸塩に対して permeable になったことの指標となる。

分析

わずかに修正を加えたChaoの方法[Anal. Chem., Vol. 28, p. 175
6 (1956)]を用いる無機リンの測定によってリン脂質を定量した。
K₂Fe(CN)₆の濃度は420 μ Mでの吸収を測定することによって
調べた。³H-ラフィノースおよびイヌリン[¹⁴C]カルボン酸はBeck
man LS 7500 液体シンチレーション計数管での放射の計数によって
定量した。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明の範囲
はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

本実施例は、噴霧乾燥中に SUV を安定化するスクロースの能力
を説明するものである。超音波処理した POPC/DOPS (モル
比 7:3) の分散液を、上記のように 10% スクロース含有の 10
 μ M リン酸緩衝液 (pH 7) を用いて調製した。噴霧乾燥工程が SUV
分散の形態 (即ち、平均小粒径および寸法分布) を変えなかったこ
とを第 1 図に示す。噴霧乾燥前の SUV のゲル透過パターン、およ
びリン脂質を噴霧乾燥して再分散した後のパターンを、それぞれ第

および寸法の分布にはわずかに作用しなかった (第 2 D 図)。上記
の結果は比降試験によってさらに裏付けられる。10% スクロース
含有のリン酸緩衝液中の超音波処理した POPC/DOPS 分散液
を、12000 rpm で 5 分間遠心した。この遠心操作によって、超
音波処理していない分散液中に存在するリン脂質リゾームは定量
的にベレット化されることがわかった。超音波処理した POPC/
DOPS 分散液を、噴霧乾燥前、および噴霧乾燥と乾燥残液の再分
散の後に、12000 rpm で 5 分間遠心した。この両者において、
生成したベレットは分散した全リン脂質の 2.5% 量であった。こ
の実験により、10% スクロースの存在下での噴霧乾燥工程の間に
SUV が實質的に保たれることが確かめられた。

実施例 2

本実施例は、スクロースが存在しないときには、実施例 1 で用い
たものと同じ超音波処理 POPC/DOPS 分散液が噴霧乾燥の間に
凝集と融合を経ることを示すものである。リン酸緩衝液 (pH 7)
中の超音波処理 POPC/DOPS (モル比 7:3) の分散液 (50

1 D 図および第 1 E 図に示す。これらの溶出パターンは極めて類似
しているが、第 1 F 図の重量のパターンから明らかなように完全に
は重ね合わせることができない。SUV の主ピーク (第 1 D 図およ
び第 1 E 図) は溶出容量 $V_e = 19.3$ ml で溶出し、これは 125 Å
のストークス (Stokes) 半径に対応している (12.5 μ m)。第 1 F 図
に示した重量のプロフィールは、噴霧乾燥-再水和のサイクルが S
UV の若干の凝集および/または融合につながることを示した。凝
集/融合の程度のおおざっぱな評価は重量のプロフィールから得る
ことができる: 凝集/融合を受けたリン脂質は 10% を超えなかつ
た。セファロース 4 B のゲル透過から得られた結論は凍結破壊電子
顕微鏡によって支持された。第 2 図は、リン酸緩衝液中の超音波処
理した POPC/DOPS (モル比 7:3) の分散液が 10% スク
ロースの存在下および存在下の両方で直径 18-70 μ m の SUV
からなることを示している (それぞれ、第 2 A 図および第 2 B 図)。
これら分散液を噴霧乾燥にかけ、この乾燥残液を水に再溶解しても、
スクロースが緩衝液中に存在しているときには、平均の小粒径の寸法

を (第 2 C 図) を上記のように調整した。緩衝液中に脂を全く含んでい
ないこの分散液を噴霧乾燥にかけ、乾燥残液を水中に再分散させると、
粒子径の劇的な変化が導かれた (第 2 C 図)。凍結破壊試料の電子顕
微鏡観察により、直径が ~ 0.2 から 2 μ m の大きい主として単一薄
層状の小胞の存在が明らかになった (この大きい小胞はその水性内
容中に封入された比較的小さい小胞を含んでいる)。第 2 C 図に示
した電子顕微鏡写真は、超音波処理していない POPC/DOPS
(モル比 7:3) 分散液で撮った電子顕微鏡写真に極めて類似して
いる。この結果は、スクロースの存在しないところでは SUV が噴
霧乾燥の間に大きな凝集と融合を経ることを示している。また、脂
の存在しないところでの噴霧乾燥によって誘導されるこの融合過程
は遠心によっても示される。噴霧乾燥し、乾燥リン脂質を水に再分
散した後に、このリン脂質分散液を 12000 rpm で 5 分間遠心し
た。この条件下では 97% のリン脂質がベレットになった。この実
験は、噴霧乾燥してその乾燥リン脂質を再分散した後の超音波処理
POPC/DOPS (モル比 7:3) 分散液が超音波処理していな

いものと同様によるまうことを示すものである。

実施例3

本実施例は実施例1の繰り返しである。10%スクロースを加えた10mMリン酸緩衝液(pH 7)中の超音波処理したリン脂質分散液POPC/DOPS(モル比=7:3)を前記のように調製した。噴霧乾燥前の濃度は50mg/mlであった。超音波処理したリン脂質分散液の平均小粒径および寸法分布を、噴霧乾燥の前後に、セファロース4Bのゲル濾過によって測定した。噴霧乾燥前には、SUVは $V_0=19.2\text{ml}$ で抽出し、これはストークス半径12.5nmに対応していた。噴霧乾燥してその乾燥リン脂質を水に再分散した後は、抽出パターン中の主ピークは $V_0=18.6\text{ml}$ にあった。この若干低い抽出容量 V_0 の値は、比較的大きい平均小粒径を反映したものであり、このようにして得たストークス半径は13.6nmであった。

実施例4

本実施例においては、実施例1〜3で用いた合成のリン脂質のか

(pH 7)中の超音波処理POPC/DOPS(モル比=7:3)の分散液を前記のように調製した。本実施例ではリン脂質2分子層をCAT16で標識した。ESRスペクトルのセンターラインのシグナルの高さを記録した(=100%)。10mMのアスコルビン酸ナトリウムを加えた後には、このシグナルの高さは、アスコルビン酸塩と2分子層表面の外側に位置するCATとの相互作用のために33%まで低下した。この分散液を噴霧乾燥し、乾燥リン脂質を水に再分散した。噴霧乾燥した後にはESRシグナルは全く検出されず、このことは、噴霧乾燥の間にアスコルビン酸塩が2分子層を越え、2分子層表面の内部に存在していた残存のCAT分子を減少させたことを示すものである。

実施例5

リン脂質SUVを実施例5と全く同じ方法で調製した。超音波処理したリン脂質分散液を用いた。その半分を10mMアスコルビン酸ナトリウムに調製した。アスコルビン酸ナトリウムの添加の前後にESRスペクトルを測定した。実施例5に記した結果を再現する

わりに天然のリン脂質を用いた。超音波処理リン脂質分散液を、卵黄ホスファチジルコリンおよび雄牛脳ホスファチジルセリン(モル比=7:3)から調製した。この天然のリン脂質混合物のモル比は、実施例1〜3で用いた合成のリン脂質混合物のものと同一であった。0.01Mリン酸緩衝液、10%スクロース中の卵ホスファチジルコリンと雄牛脳ホスファチジルセリンの超音波処理リン脂質分散液は、実施例1〜3と同じ方法で調製した。こうして得た超音波処理リン脂質分散液の平均小粒径と寸法分布を、セファロース4Bのゲル濾過によって調べた。噴霧乾燥の前後に分散液をセファロース4Bのクロマトグラフィーにかけた。得られた結果は実施例1および3に記した結果と極めて類似していた。この結論は、天然のリン脂質の混合物は合成のリン脂質と同様によるまうということである。

実施例6

本実施例は、SUVの小粒径法は噴霧乾燥の間に実質的に維持されるが、2分子層はアスコルビン酸塩に対して透過性になることを示すものである。10%スクロース含有の0.01Mリン酸緩衝液

ことができた。リン脂質分散液の残りの半分は噴霧乾燥し、その乾燥リン脂質を適切な量の水に再分散した。ESRスペクトルを記録し、ESRスペクトルのセンターラインのシグナルの高さを測定した(=100%)。この分散液に10mMアスコルビン酸ナトリウムを加え、ESRスペクトルを記録した。アスコルビン酸塩の添加によりシグナルの高さが減少した(=31%)。この31%の値は、噴霧乾燥前に同一の分散液で測定された値と実質的に同一である。噴霧乾燥前に脂質分散液に10mMアスコルビン酸塩を添加すると、センターシグナルの高さを33%に減少させた。本実施例の結論は以下の通りである：

(1)噴霧乾燥の前後で同様の量のシグナル高さが得られたという事実は、10%スクロースの存在下では噴霧乾燥の間に小粒径の寸法および寸法の分布が有意に変化することができないことを意味している。この結論は他の方法、例えばセファロース4Bでのゲル濾過、凍結-乾燥電子顕微鏡および透心などによって得られた結論と一致する。

(2) 噴霧乾燥の際に2分子層がアスコルビン酸塩に対して透過性になる。このことは、卵ホスファチジルコリン2分子層が室温でアスコルビン酸ナトリウムに対して透過性になることがわかってい

ことを考慮するとそれほど驚くべきことではない。さらに、実施例6に記した実験は、噴霧乾燥の際に生じたすべての2分子層の製品が可逆性であることを示唆している。

実施例7

10%スクロースを加えたリン酸緩衝液中の超音波処理POPC/DOPS分散液(モル比 7:3)を前記のように調製する。前記のようにして³H-標識したラフィノースを小胞の内部に封入し、外側の³HラフィノースをセファデックスG-50のゲル濾過によって除去する。ラフィノースが封入されたSUVからなるこの脂質分散液を、噴霧乾燥の前夜に、セファロース4Bのクロマトグラフィーにかけた。噴霧乾燥の前には、95%のラフィノースが小胞のピークとともに溶出することがわかった。噴霧乾燥の後には、85%のラフィノースがSUVとともに溶出した。即ち、本実験は、噴霧乾

噴霧乾燥中に2分子層の脂質が損傷のままであり、イオンがリン脂質2分子層を貫通しないということを結論させる。

上記の実施例から、本発明が脱水中の小胞の保存を提供するものであることが明らかである。具体的には、5-10%(0.15-0.3M)のスクロースの存在下、リン脂質(POPC/DOPS:モル比 7:3)から調製されたSUVは噴霧乾燥中に保存された。糖が存在しないと、噴霧乾燥はSUVの凝集と融合を導いた。荷電したリン脂質のSUVの場合には、大きな単一薄層状の小胞が生成した。小胞を脱水状態で保存することによって、小胞の利用性を損なうことなく、あるいは封入されたあらゆる物質が漏出することなく、小胞の凝集または融合が避けられ、小胞を長期間貯蔵することができる。

特定の適用を参考にして本発明を説明したが、本発明の本質には当業者が目明であるその他の適用も含まれる。即ち、本発明は、本明細書に添付した請求の範囲に示した範囲でのみ限定されるものである。

他の間にラフィノースが少なくとも90%まで実質的に封入されたままであることを示すものである。

実施例8

ラフィノースの代わりに¹⁴C-イヌリンカルボン酸を封入すること以外は同じ方法を用いて実施例7に記載の実験を行った。上記の結果から予想されるように、小胞内部に封入されたイヌリンは噴霧乾燥中に封入されたままであることが本実施例8からわかった。

実施例9

10%(0.3M)スクロースを加えた0.01Mリン酸緩衝液(pH 7)中のPOPC/DOPS(モル比=7:3)の超音波処理リン脂質分散液を実施例7の記載のように調製した。K₂Fe(CN)₆を封入するため、この緩衝液に0.1MのK₂Fe(CN)₆を加えた。外側に存在するK₂Fe(CN)₆をセファデックスG-50のゲル濾過により除去した。次いで、実施例7の記載のように実験を行った。K₂Fe(CN)₆を含有するSUVのリン脂質分散液を噴霧乾燥した後には、約90%のK₂Fe(CN)₆がSUVとともに溶出した。本実験は、

Fig. 14.

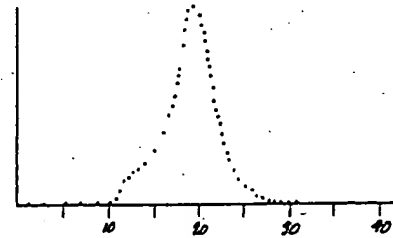


Fig. 15.

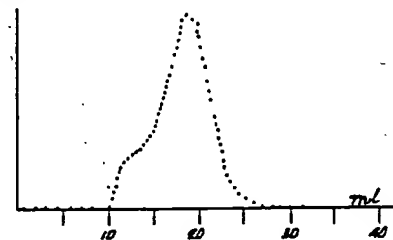
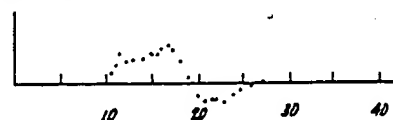


Fig. 16.





INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁴ : A61K 9/66, 37/22, B01J 13/02	A1	(11) International Publication Number: WO 88/06441 (43) International Publication Date: 7 September 1988 (07.09.88)
(21) International Application Number: PCT/US88/00408 (22) International Filing Date: 22 February 1988 (22.02.88) (31) Priority Application Number: 018,190 (32) Priority Date: 24 February 1987 (24.02.87) (33) Priority Country: US (71) Applicant: VESTAR, INC. [US/US]: 650 Cliffside Drive, San Dimas, CA 91772 (US). (72) Inventor: HAUSER, Helmut, Otmar ; Schwarzbach Strasse 89, CH-8713 Uerikon (CH). (74) Agents: THOMSON, William, E., Jr. et al.; Lyon & Lyon, 611 West 6th Street - 34th Floor, Los Angeles, CA 90017 (US).	(81) Designated States: AT (European patent), AU, BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), DK, FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, KR, LU (European patent), NL (European patent), NO, SE (European patent). Published With international search report.	
(54) Title: DEHYDRATING VESICLE PREPARATIONS FOR LONG-TERM STORAGE		
<div data-bbox="331 1081 1023 1871"> (57) Abstract In the presence of a preserving additive, unilamellar phospholipid vesicle preparations are preserved during dehydration so that they can be stored for extended periods of time and aggregation or fusion of the vesicles is avoided without sacrifice of the utility of the vesicles or leakage of any enclosed material. The preserving additive is a carbohydrate, disaccharide, alcohol, protein, gum arabic or monosaccharide. Dehydration is effected by subjecting the preparations to a drying operation capable of causing flash evaporation. The vesicles upon reconstitution may have therapeutic and/or diagnostic agents incorporated in their internal aqueous cavities. </div> <div data-bbox="1023 1081 1489 1871"> </div>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	ML	Mali
AU	Australia	GA	Gabon	MR	Mauritania
BB	Barbados	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BE	Belgium	HU	Hungary	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	IT	Italy	NO	Norway
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Romania
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland				

-1-

DESCRIPTIONDEHYDRATING VESICLE PREPARATIONS FOR LONG-TERM STORAGEField of the Invention

The invention described relates generally to the preservation of vesicles during dehydration procedures in the presence of a preserving additive whereby the integrity of the vesicle bilayer is maintained, aggregation or fusion is avoided, and there is no sacrifice of the utility of the vesicles.

One embodiment of the present invention is directed to vesicles preserved by spray-drying. Vesicles useful in the present invention include phospholipid vesicles inclusive of single unilamellar vesicles. The aforementioned preserved vesicles can be used, upon rehydration, for any purpose that vesicles not subjected to dehydration would be used.

Background of the Invention

Liposomes are described quite widely in the literature and their structure is well known. Liposomes are unilamellar or multilamellar lipid vesicles which enclose a fluid space or spaces. The walls of the vesicles are formed by a bimolecular layer of one or more lipid components having polar heads and nonpolar tails. In an aqueous (or polar) solution, the polar heads of one layer orient outwardly to extend into the surrounding medium, and the non-polar tail portions of the lipid associate with each other, thus providing a polar surface and non-polar core in the wall of the vesicle. Unilamellar liposomes have one such bimolecular layer, whereas multilamellar liposomes generally have a plurality of substantially concentric bimolecular layers.

A variety of methods for preparing liposomes are known, many of which have been described by Szoka and

-2-

Papahadjopoulos, Ann. Rev. Biophysics Bioeng. 9: 467-508 (1980) and in Liposome Technology, Preparation of Liposomes, Vol I, Gregoriadis (Ed.), CRC Press, Inc. (1984). Also, several liposome encapsulation methods are disclosed in the patent literature, notably in United States Patent No. 4,235,871, issued to Papahadjopoulos et al. on November 25, 1980, and in United States Patent No. 4,016,100, issued to Suzuki et al. on April 5, 1977.

In order for liposomes to be useful in commercial settings, it is desirable to extend the shelf-life of liposomal preparations. Such preparations must have long enough shelf-lives to allow them to be easily manufactured, shipped and stored by intermediate and ultimate users under a variety of temperature conditions. With particular regard to the pharmaceutical industry, it is important to be able to store liposomal preparations for long periods of time without incurring substantial leakage of the incorporated drug.

Liposomal stability on storage is defined generally as the extent to which a given preparation retains both its original structure and size distribution and if applicable, its load of incorporated agent, whether therapeutic or diagnostic in nature. Instability can occur, for example, when vesicle size increases spontaneously upon standing as a result of fusion of colliding vesicles. The larger vesicles will exhibit drastically different pharmacokinetics in vivo because their size determines their clearance rates and tissue distribution; for instance, large liposomes are removed from the circulation more rapidly than smaller ones. In addition, liposomes in an aqueous liposome dispersion can aggregate and precipitate as a sediment. Although such sediments can usually be re-dispersed, the structure and size distribution of the original dispersion may be changed. Finally, another important factor with regard to instability is that incorporated substances of low molecular weight are likely to leak from stored

-3-

liposomes. See generally G. Gr goriadis, Liposomes for Drugs and Vaccines in 3 Trends in Biotechnology, 235-241 (1985). If the content of the incorporated agent is small and/ or the volume of the external aqueous medium is large, such leakage can represent a significant proportion of the total content of the agent in the liposomes.

Research directed to prolonging liposomal stability on storage has focused on liposome preservation in the form of lyophilization. Lyophilization refers to the process whereby a substance is prepared in dry form by rapid freezing and dehydration under high vacuum. Traditional wisdom dictates that phospholipid vesicles cannot be lyophilized successfully. Recent studies done by Drs. John and Lois Crowe at the University of California at Davis indicate that the disaccharide, trehalose, functions as a cryoprotectant during lyophilization and the studies conclude that optimal results are achieved when the cryoprotectant is located inside as well as outside the liposome. L.M. Crowe, et al., 1 Archives of Biochemistry and Physics 242 (1985). See also J.H. Crowe, L.M. Crowe, Cryobiology, 19, 317 (1982) In Biological Membranes, D. Chapman, Ed. (Academic Press, N.Y. 5, 57) in which it was reported that certain organisms such as nematodes, were able to survive dehydration in the presence of trehalose. Battelle Memorial Institute, Basel, has also disclosed the use of proteins and polysaccharides as liposome preservation agents during lyophilization, resulting in reported undamaged liposome levels of only approximately 70%. Schneider, et al., Process for the Dehydration of a Colloidal Dispersion of Liposomes, United States Patent No. 4,229,360 (Oct. 21, 1980). Several other patents have been issued which disclose various methods to preserve liposomes utilizing lyophilization techniques. Evans, et al., Process for Preparing Freeze-Dried Liposome Compositions, United States No: 4,370,349

-4-

Jan. 25, 1983); Weiner, et al., Storage-Stable Lipid Vesicles and Method of Preparation, United States Patent No. 4,397,846 (Aug. 9, 1983); Vanlerberghe, et al., Storage Stability of Aqueous Dispersions of Spherules (Jan. 27, 1981). The stabilizing effect of sugars on sarcoplasmic reticulum subjected to freeze-drying and rehydration, and on microsomes and egg phosphatidylcholine SUV subjected to freeze-thawing have also previously been noted.

10 Lyophilization is an expensive procedure and would require considerable plant investment in order to produce dehydrated liposomal preparations on a commercial scale. Spray drying and scrape surface drying (drum-drying) techniques, described generally in Hansen, Method of
15 United States Patent No. 3,549,382 (Dec. 22, 1970), are less expensive to utilize commercially. Moreover, such techniques require the use of less energy than does the lyophilizing technique. Thin film evaporation constitutes an equivalent technology to spray-drying and scrape
20 surface drying. Each of these three techniques is capable of causing flash evaporation, or rapid vaporization of a dispersion medium without damaging the integrity of the materials, in the present case liposomes, suspended in that medium. Such vaporization
25 occurs in a temperature range of about 60°C. to about 150°C.

Recently unilamellar lipid vesicles have become important in several research areas dealing with membrane mediated processes such as membrane fusion, interfacial
30 catalysis, energy conduction and conversion, drug delivery and targeting. There is hope that this kind of research will eventually lead to industrial applications of unilamellar lipid vesicles. In any practical application the questions of long-term storage and related to
35 it vesicle and bilayer stability are important. It is well-known that aqueous dispersions of small unilamellar lipid vesicles (SUV) are thermodynamically unstable. For

-5-

instance, SUV made of zwitterionic phosphatidylcholines tend to aggregate and/or fuse to large multilamellar lipid particles at room temperature. Furthermore, they undergo chemical degradation with time. The process of fusion of SUV is greatly accelerated when SUV are subjected to freeze-thawing or dehydration. It has been shown that SUV of egg phosphatidylcholine revert to large multilamellar structures upon freezing and thawing. G. Struass and H. Hauser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2422 (1986), the disclosure of which is incorporated herein by reference. SUV are therefore an ideal system to test the stabilizing effect of various additives and to test dehydration by spray-drying or an equivalent technology.

15 Summary of the Invention

The invention described herein is directed to the preservation of phospholipid vesicles through spray-drying and equivalent technologies in the presence of preserving additives.

20 The present invention contemplates drying methods capable of causing flash evaporation, or rapid vaporation of a dispersion medium. Spray drying and other equivalent technologies such as scrape surface drying or thin film evaporation can be used in the present invention.

25 In one embodiment, small unilamellar phospholipid vesicles are preserved by spray-drying in the presence of 5-10% (0.15-0.3M) sucrose.

Brief Description of the Drawings

30 Figure 1D graphically illustrates the typical elution profile of a sonicated phospholipid dispersion (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine (POPC) /dioleoyl-sn-phosphatidyl-serine monosodium salt (DOPS), mole ratio 7:3 in buffer containing 10% (0.3M) sucrose.

-6-

Figure 1E graphically illustrates the elution profile of the same sonicated dispersion after subjecting it to spray-drying.

Figure 1F graphically illustrates the difference profile when the above two elution profiles (1A and 1B) are superimposed.

Figure 2 shows electron micrographs of sonicated mixed phospholipid dispersions of POPC/DOPS (mole ratio 7:3).

10 Detailed Description

Abbreviations and Definitions

SUV = small unilamellar vesicles

EPC = egg phosphatidylcholine

POPC = 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine

15 DOPS = monosodium salt of dioleoyl-sn-phosphatidyl-serine

ESR = electron spin resonance

CAT 16 = 4-(N,N-dimethyl-N-hexadecyl) ammonium-
2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl,
20 iodide.

As used herein, "vesicle" refers to a micelle which is in a generally spherical form with an internal aqueous compartment, often obtained from a lipid which forms a bilayered membrane and is referred to as a "liposome."

25 "Micelle" refers to a particle which results from aggregation of amphiphilic molecules. In this invention, preferred amphiphiles are biological lipids. Micelles are water-soluble aggregates of molecules with hydrophobic and hydrophilic portions (so-called amphiphilic
30 molecules) which associate spontaneously.

Methods for forming vesicles are, by now, very well known in the art. Typically, they are prepared from a phospholipid, for example, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn phosphatidylcholine and may include other materials such
35 as neutral lipids, and also surface modifiers such as positively or negatively charged compounds. As used

-7-

herein, "small unilamellar vesicle" refers to a vesicle with a simple bilayered spherical shell in the size range of less than about 2000A.

Suitable for use as a preserving additive in the present invention are any of a number of materials, including various carbohydrates, including specifically dextran and certain disaccharides such as sucrose and lactose, alcohols such as glycerol, mannitol and ethylene glycol, proteins such as ovoalbumin, and gum arabic. As used in the following examples, sucrose is illustrative of a suitable dissacharide. It will be understood by those skilled in the art that other preserving additives can be utilized within the confines of the present invention.

The vesicles of this invention are preferably in the form of small (less than 2000A) unilamellar phospholipid vesicles prepared by sonication as described by M. R. Mauk and R. C. Gamble, Anal. Bioc., 94, p. 302-307 (1979), or by microemulsification using the procedures described in a co-pending application by R. Gamble filed January 31, 1985, and assigned to the same assignee as this application, both incorporated by reference herein.

Any of a variety of compounds can be enclosed in the internal aqueous compartment of the vesicles. Illustrative therapeutic agents include antibiotics, metabolic regulators, immune modulators, chemotherapeutic drugs, toxin antidotes, etc. By the same token, the vesicles may be loaded with a diagnostic radionuclide and fluorescent materials or other materials that are detectable in in vitro and in vivo applications.

In the preferred embodiment of this invention, the vesicles are preferably small unilamellar phospholipid vesicles which are subjected to spray-drying in the presence of preserving additives.

The present invention is most advantageous as it preserves the vesicles during the dehydration and subsequent rehydration. By "preservation", it is meant

-8-

that average size and size distribution are not affected, that little or no fusion or aggregation is observed upon rehydration, that the vesicle bilayer integrity is maintained, and that there is no sacrifice of the utility of the vesicle.

Materials and Methods

Materials

Dioleoyl-phosphatidylserine (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine [DOPS]) was synthesized according to Hermetter et al., (1982) Chemistry and Physics of Lipids, Vol. 30, p. 35, or was a gift of Ciba-Geigy (Basel, Switzerland). 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine (POPC), 1,2-palmitoyl-sn-phosphatidylcholine, 1,2-dioleoyl-sn-phosphatidylcholine were all synthesized according to Paltauf et al., (1971) Biochimica Biophysica Acta Vol. 249, p. 539. Egg phosphatidylcholine and ox brain phosphatidylserine were purchased from Lipid Products (Surrey, U.K.). The phospholipids used were 99% pure as determined by TLC. Sucrose, trehalose and glucose were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.). Ascorbic acid was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). 4(N,N-dimethyl-N-hexadecyl)ammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1,3-oxyl bromide (CAT 16) was purchased from Molecular Probes (Junction City, Oregon). $K_3Fe(CN)_6$ was obtained from Merck (Darmstadt, F.R.G.). $^3H(G)$ - raffinose was a product of New England Nuclear (Boston, Massachusetts) while inulin [C^{14}]carboxylic acid (Mr = 5200) was obtained from Amersham International (Amersham, U.K.). Sephadex G-50 and Sepharose 4B were purchased from Pharmacia Fine Chemicals AB (Zurich, Switzerland).

Methods

Vesicle Preparation

Sonicated phospholipid dispersions were prepared as described previously (Brunner et al., (1978), Journal of

-9-

Biological Chemistry, Vol. 253, p. 7538). Briefly, 250 mg of phospholipid, e.g. POPC and DOPS, mole ratio 7:3) together with 1.7 mg CAT 16, if desirable, were dissolved in 10 ml $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH} = 2:1 \text{ Vol/Vol}$), and the solution of phospholipid in organic solvent was dried by rotary evaporation. The film was dried in high vacuo ($< 10^{-3}$ torr), and the phospholipid dispersion was made by suspending the dry phospholipid film in 5 ml 10 mM sodium phosphate buffer pH7 containing 5-10% (0.15-0.3M) sucrose (usually 10% sucrose was used). The phospholipid concentration was 50mg/ml unless otherwise stated, and the phospholipid to spin label (CAT 16) mole ratio was 100:1. The 5 ml dispersion was subjected to ultrasonication using a Branson B12 sonicator with a standard microtip. Sonication was carried out for 50 minutes in a glass vessel with a planar bottom, in an N_2 - atmosphere; the sample tube was immersed in ice - H_2O and the sonicator was used in the pulsed mode (50% duty cycle), i.e., alternating 30 second periods of sonication and cooling were applied. After sonication the sample was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes to remove Ti released from the tip of the sonicator. The sonicated phospholipid dispersion was diluted with buffer to a total volume of 50ml (dilution factor = 10). 45 ml of the diluted sonicated dispersion were spray-dried using a Buchi spray-drying apparatus as described below. Any compound (material) to be entrapped in the internal aqueous cavity of the small unilamellar vesicles (SUV) formed by sonication, was added to the 10mM phosphate buffer pH7 used to disperse the dry phospholipid film. In this way, $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$, ^3H -raffinose and ^{14}C -inulin carboxylic acid were encapsulated. External $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$, ^3H -raffinose or ^{14}C -inulin carboxylic acid were removed from SUV by gel filtration on Sephadex G-50 (medium). (Column dimension 19cm x 2 cm). Conditions of gel filtration: 3 ml phospholipid dispersion (80 mg/ml) were applied, the eluant was collected in a fraction

-10-

collector, 15 drops = 0.91 ml were collected per fraction, flow rate: 75 ml/hour. The eluant was analyzed for phosphate; fractions containing phospholipid were pooled and diluted to 50ml. 45 ml of the diluted phospholipid dispersion were spray-dried in the Buchi spray-drying apparatus (see below).

Methods

Spray-Drying

A Buchi spray-drying apparatus (Buchi Laboratory-Techniques, Flawil, Switzerland) was used. 45 ml of the diluted sonicated phospholipid dispersion were spray-dried (phospholipid concentration: 5mg/ml). The following instrumental parameters were used: pressure: 4bar; spray-flow: 520; aspirator: position 0; pump: position 1; heating rate: 8.7-8.9; inlet temperature: $140 \pm 5^\circ\text{C}$; outlet temperature: 64°C .

After spray-drying both cyclones and all connections were rinsed with 20-30 ml H_2O to rehydrate the dry phospholipid powder. The amount of water used to redisperse the dried phospholipid was adjusted to yield a phospholipid dispersion of similar concentration to that in the original dispersion (before spray-drying). The phospholipid was redispersed by gentle hand-shaking. The amount of phospholipid recovered after spray-drying varied between 50-75%. After spray-drying the purity of the lipid was checked by TLC. The procedure of spray-drying did not cause any detectable degradation of the phospholipids.

Gel Filtration of Phospholipid Dispersions On Calibrated

Sephacrose 4B Columns

Gel filtration of sonicated phospholipid dispersions (consisting mainly of SUV) was carried out as described in detail by Schurtenberger and Hauser (1984), *Biochimica Biophysica Acta*, Vol. 778, p. 470. The calibration of

-11-

the Sepharose 4B resin is also described in this reference.

Quasi-Elastic Light Scattering

5 Phospholipid vesicles were sized on a home-built instrument consisting of an argon-ion laser (Spectra Physics, Model 171, $\lambda=514.5\text{nm}$), a temperature-controlled scattering cell holder, a digital autocorrelator (Malvern K 7023, 96 channels) and an on-line Nova 3 computer (Haller, H.R. (1980), Dissertation 6604, ETH Zurich).

10 Freeze-Fracture Electron Microscopy

Phospholipid dispersion samples for freeze-fracture electron microscopy were cryofixed, fractured and replicated as described by Hauser et al. (1983), Biochemistry 22: 4775 and references cited therein, the
15 disclosures of which are incorporated herein by reference.

ESR - Measurement

In order to monitor the bilayer integrity and barrier properties an electron spin resonance test was
20 used which was described in a previous publication (Strauss and Hauser, (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 83, p. 2422, the disclosure of which is incorporated herein by reference). The spin label CAT 16 was incorporated in the phospholipid bilayer at a mole ratio
25 of lipid to label of -100:1. The free radical of this spin label is located in the polar group region of the bilayer. In sonicated dispersions consisting of SUV, the label is randomly distributed between the outer and inner layer of the bilayer, i.e., about 65-70% of the label is
30 located on the external bilayer surface, the remainder is present on the inner bilayer surface. The phospholipid dispersion was cooled to 0° and 30mM sodium ascorbate was added. Sodium ascorbate, which is a reducing agent impermeable to phospholipid bilayers at 0°C will interact

-12-

with the spin label located on the external bilayer surface. As a result 65-70% of the spin label intensity was quenched. Loss of the remaining "inner" ESR signal, which in intact membranes was one-third of the total signal, is an indication that the bilayer becomes leaky for ascorbate.

Analytical Methods

Phospholipids were quantified by determination of inorganic phosphorus using a slightly modified version of the method of Chen et al. (1956), Anal. Chem., Vol. 28, p. 1756. The concentration of $K_3Fe(CN)_6$ was determined by absorption measurement at 420 nm. 3H -raffinose and inulin [^{14}C] carboxylic acid were quantified by radio counting in a Beckman LS 7500 liquid scintillation counter.

The following examples are presented, to illustrate the invention, and are not intended to limit the scope thereof.

Example 1

This example illustrates the ability of sucrose to stabilize SUV during spray-drying. A sonicated dispersion of POPC/DOPS, mole ratio 7:3 was prepared in 10mM phosphate buffer pH 7 containing 10% sucrose as described above. That the process of spray-drying did not change the morphology of the SUV dispersion (i.e. average vesicle size and size distribution) is illustrated in Fig. 1. The gel filtration pattern of SUV before spray-drying and that after spray-drying and redispersing the phospholipids are shown in Figs. 1D and E, respectively. The elution patterns were very similar but not completely superimposable as evident from the difference pattern in Fig. 1F. The main peak of SUV (Fig. 1D and E) was eluted at an elution volume $V_e = 19.3$ ml corresponding to a Stokes radius of 125 Å (72.5 nm). The difference profile shown in Fig. 1F indicated

-13-

that the spray-drying-rehydration cycle leads to some aggregation and/or fusion of SUV. A rough estimate of the extent of aggregation/fusion can be derived from the difference profile: not more than 10% of the phospholipid underwent aggregation/fusion. The conclusions derived from gel filtration on Sepharose 4B were supported by freeze-fracture electron microscopy. Fig. 2 demonstrates that sonicated dispersions of POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) in phosphate buffer consisted of SUV of a diameter of 18-70 nm, both in the absence and presence of 10% sucrose (Fig. 2A and B, respectively). Subjecting these dispersions to spray-drying and redissolving the dry residue in H₂O had little effect on the average vesicle size and size distribution provided sucrose was present in the buffer (Fig. 2D). The conclusions discussed above are further corroborated by sedimentation experiments. The sonicated POPC/DOPS dispersion in phosphate buffer containing 10% sucrose was centrifuged at 12000 x g for 5 min. This centrifugation procedure has been shown to quantitatively pellet phospholipid liposomes present in unsonicated dispersions. The sonicated POPC/DOPS dispersion was centrifuged at 12000 x g for 5 min. before spray-drying and after spray-drying and redispersing the dry residue. In both instances, the pellet formed amounted to 2.5% of the total phospholipid dispersed. This experiment confirms that SUV are essentially retained during the process of spray-drying in the presence of 10% sucrose.

Example 2

This is to illustrate that the same sonicated POPC/DOPS dispersion as used in Example 1 undergoes aggregation and fusion during spray-drying if sucrose is absent. A sonicated dispersion of POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) in phosphate buffer pH7 (50mg/ml) was prepared as described previously. Subjecting this dispersion, which did not contain any sugar in the buffer, to spray-drying

-14-

and redispersing the dry residue in H₂O led to drastic changes in the particle size. (Fig. 2C). Electron Microscopy of freeze-fractured samples revealed the presence of large mainly unilamellar vesicles of diameter 5 -0.2 to 2 μ m which contain smaller vesicles entrapped in their aqueous cavity. The electron micrograph shown in Fig. 2C closely resembles electron micrographs taken of unsonicated POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) dispersions. This result indicates that SUV undergo extensive 10 aggregation and fusion during spray-drying in the absence of sucrose. This fusion process induced by spray-drying in the absence of sugar is also indicated by centrifugation. After spray-drying and redispersing the dry phospholipid in H₂O, the phospholipid dispersion was 15 centrifuged at 12000 x g for 5 min: 97% of the phospholipid was pelleted under these conditions. This experiment demonstrates that a sonicated POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) dispersion after spray-drying and redispersing the dry phospholipid behaves like an 20 unsonicated one.

Example 3

Repeat of example 1. The sonicated phospholipid dispersion POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) in 10mM phosphate buffer pH7 plus 10% sucrose was prepared as described 25 previously. The concentration was 50 mg/ml before spray-drying. The average vesicle size and size distribution of the sonicated phospholipid dispersion was determined by gel filtration on Sepharose 4B before and after spray-drying. Before spray-drying, SUV eluted at $V_e = 19.2$ ml 30 cooresponding to a Stokes radius of 12.5 nm. After spray and redispersing the dried phospholipid in H₂O, the main peak in the elution pattern was at $V_e = 18.6$ ml. This somewhat lower value of the elution volume V_e reflects a larger average vesicle size, the Stokes radius thus 35 derived was 13.6 nm.

-15-

Example 4

In this example naturally occurring phospholipids were employed instead of the synthetic phospholipids used in examples 1-3. A sonicated phospholipid dispersion was made consisting of egg yolk phosphatidylcholine and ox brain phosphatidylserine (mole ratio = 7:3). The mole ratio of the naturally occurring phospholipid mixture was the same as that of the synthetic phospholipid mixture used in examples 1-3. The sonicated phospholipid dispersion of egg phosphatidylcholine and ox brain phosphatidylserine in a 0.01M phosphate buffer, 10% sucrose was prepared in the same way as in examples 1-3. The sonicated phospholipid dispersion thus obtained was analyzed for the average vesicle size and size distribution using gel filtration on Sepharose 4B. The dispersion was chromatographed on Sepharose 4B before and after spray-drying. The results obtained were very similar to those discussed in examples 1 and 3. The conclusion is that the mixture of naturally occurring phospholipids behaved like that of the synthetic phospholipids.

Example 5

This example shows that the vesicle size of SUV is essentially maintained during spray-drying, but the bilayer becomes permeable to ascorbate. A sonicated dispersion of POPC/DOPS (mole ratio = 7:3) in 0.01 M phosphate buffer pH7 containing 10% sucrose was prepared as described previously. In this case the phospholipid bilayer was labeled with CAT 16. The signal height of the center line of the ESR spectrum was recorded (= 100%). After addition of 10mM sodium ascorbate this signal height dropped to 33% because of the interaction of ascorbate with CAT located on the external bilayer surface. The dispersion was spray-dried and the dry phospholipid was redispersed in H₂O. After spray-drying no ESR signal was detected indicating that during spray-

-16-

drying ascorbate had crossed the bilayer and reduced the remaining CAT molecules located on the internal bilayer surface.

Example 6

5 Phospholipid SUV were prepared in exactly the same way as described in example 5. The sonicated phospholipid dispersion was involved. One half was made 10 mM in sodium ascorbate. The ESR spectrum was measured before and after the addition of Na⁺ ascorbate. The 10 results discussed in example 5 were reproducible. The second half of the phospholipid dispersion was spray-dried and the dried phospholipid was redispersed in the appropriate amount of H₂O. The ESR spectrum was recorded and the signal height of the center line of the ESR 15 spectrum was measured (=100%). To this dispersion 10 mM sodium ascorbate was added and the ESR spectrum recorded. Addition of ascorbate produced a reduction in signal height (=31%). This value of 31% is practically identical to that measured for the same dispersion before 20 spray-drying. Before spray-drying the addition of 10 mM ascorbate to the lipid dispersion reduced the height of the center signal to 33%. The conclusions of this example are as follows:

(1) The fact that similar values were obtained for 25 the signal height before and after spray-drying means that the vesicle size and size distribution cannot have changed significantly during spray-drying in the presence of 10% sucrose. This conclusion is consistent with conclusions derived from other methods, e.g. gel 30 filtration on Sepharose 4B, freeze-fracture electron microscopy and centrifugation.

(2) The bilayer becomes permeable to ascorbate during spray-drying. This is not too surprising considering that egg phosphatidylcholine bilayers have 35 been shown to become permeable to Na⁺ ascorbate at room temperature. The experiment described in example 6

-17-

further suggests that any bilayer perturbation produced during spray-drying is reversible.

Example 7

A sonicated POPC/DOPS dispersion in phosphate buffer plus 10% sucrose (mole ratio 7:3) is prepared as described previously. ^3H - labeled raffinose is entrapped in the vesicle cavity and external [^3H ,] raffinose is removed by gel filtration on Sephadex G-50 as described previously. The lipid dispersion consisting of SUV with entrapped raffinose was chromatographed on Sepharose 4B before and after spray-drying. Before spray-drying it was found that 95% of the raffinose eluted together with the vesicle peak. After spray-drying 85% of the raffinose was eluted together with SUV. This experiment thus demonstrates that raffinose remains essentially entrapped during spray-drying at least to 90%.

Example 8

The experiment described in example 7 was carried out in the same way except that [^{14}C] inulin carboxylic acid was encapsulated instead of raffinose. As expected from the results discussed above, example 8 showed that inulin encapsulated in the vesicle cavity remained encapsulated during spray-drying.

Example 9

A sonicated phospholipid dispersion of POPC/DOPS (mole ratio=7:3) in 0.01M phosphate buffer pH 7 plus 10% (0.3M) sucrose was prepared as described in example 7. 0.1M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ was added to the buffer in order to encapsulate $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Externally present $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ was removed by gel filtration on Sephadex G-50. The experiment was then conducted as that described in example 7. After spray-drying the phospholipid dispersion of SUV containing $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, about 90% of

-18-

the $K_3 Fe (CN)_6$ was eluted with the SUV. This experiment allows the conclusion that the bilayer barrier remains intact and ions do not penetrate the phospholipid bilayer during spray-drying.

5 From the foregoing examples, it is clear that the present invention provides for the preservation of vesicles during the dehydration techniques. Specifically, in the presence of 5-10% (0.15 - 0.3 M) sucrose, SUV made of phospholipids (POPC/DOPS, mole ratio
10 7:3) were preserved during spray-drying. In the absence of the sugar, spray-drying led to aggregation and fusion of SUV. In the case of SUV of charged phospholipids large unilamellar vesicles were formed. By preserving the vesicles in a dehydrated state, the vesicles can be
15 stored for extended periods of time and aggregation or fusion of the vesicles is avoided without sacrifice of the utility of the vesicles or leakage of any enclosed material.

Although this invention has been described with
20 reference to particular applications, the principles involved are susceptible of other applications which will be apparent to those skilled in the art. The invention is, therefore, to be limited only as indicated by the scope of the claims appended thereto.

-19-

Claims

1. A method of dehydrating phospholipid vesicle preparations in the presence of a preserving additive in a dispersion medium, comprising a drying operation
5 capable of causing flash evaporation of said medium while substantially maintaining the size, size distribution and integrity of the vesicles suspended therein.
2. The method according to Claim 1 wherein said drying operation is by spray-drying, scrape-surface
10 drying or thin film evaporation.
3. The method according to Claim 1 wherein said phospholipid vesicles are less than about 2000 Å.
4. The method according to Claim 1 wherein said phospholipid vesicles are unilamellar.
- 15 5. The method according to Claim 1 wherein said phospholipids are selected from the group comprising phosphatidylcholines and phosphatidylserines.
6. The method according to Claim 5 wherein said phosphatidylcholines are egg phosphatidylcholine, 1-
20 palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine, 1,2-palmitoyl-sn-phosphatidylcholine and 1,2 dioleoyl-sn-phosphatidylcholine.
7. The method according to Claim 5 wherein said phosphatidylserines are dioleoyl-sn-phosphatidylserine,
25 1,2 dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, and ox brain phosphatidylserine.
8. The method according to Claim 1 wherein said preserving additive is selected from the group comprising carbohydrates, disaccharides, alcohols, proteins, gum
30 arabic and monosaccharides.

-20-

9. The method according to claim 8 wherein said carbohydrate is dextran, a monosaccharide or a disaccharide.

10. The method according to Claim 9 wherein said disaccharides are selected from the group comprising sucrose, lactose and trehalose.

11. The method according to Claim 9 wherein said monosaccharide is glucose.

12. The method according to Claim 8 wherein said preserving additive is sucrose.

13. The method according to Claim 12 wherein said sucrose is present in an amount from about 5% to about 10% sucrose.

14. The method according to Claim 8 wherein said alcohols are selected from the group comprising glycerol, mannitol and ethylene glycol.

15. The method according to Claim 8 wherein said protein is albumin or gum arabic.

16. The method according to Claim 1 wherein said phospholipid vesicles are incorporated with therapeutic and diagnostic agents.

17. The method according to Claim 1 wherein said vesicles upon reconstitution are incorporated with therapeutic and/or diagnostic agents.

18. The method according to Claim 1 wherein said therapeutic agents are selected from the group comprising antibiotics, metabolic regulators, immune modulators, chemotherapeutics, and toxin antidotes.

1/2

FIG. 1E.

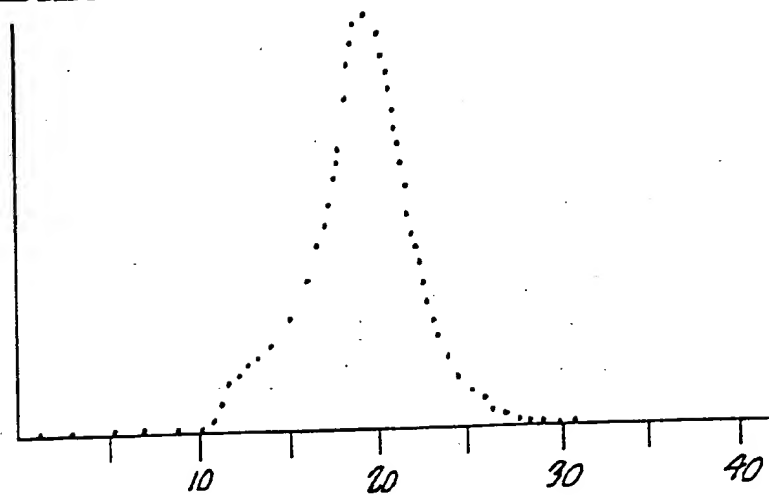


FIG. 1F.

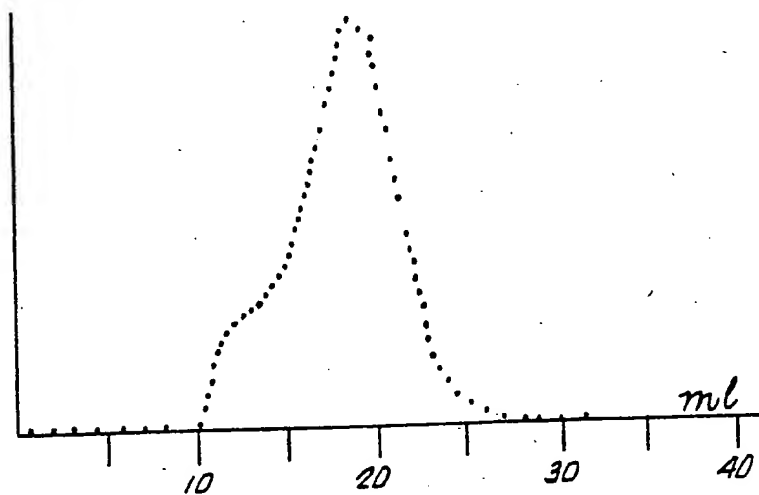
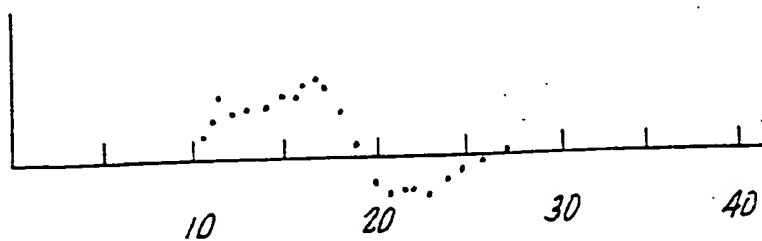


FIG. 1G.



2/2

FIG. 2A.

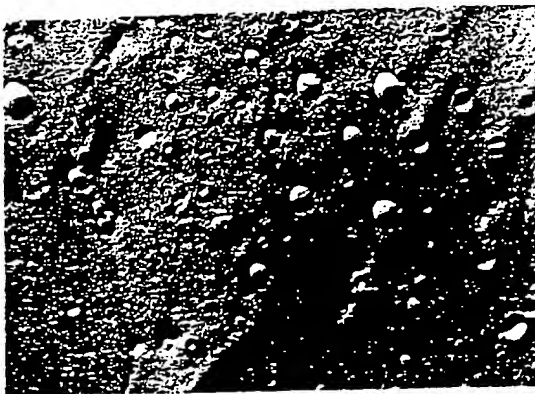


FIG. 2B.

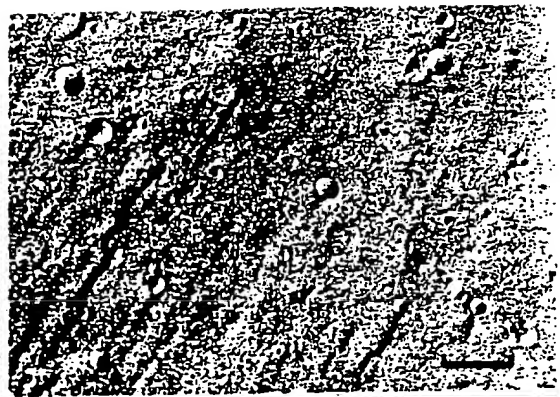


FIG. 2C.



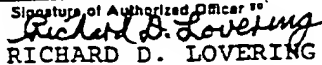
FIG. 2D.

BAR = 100 μ m

SUBSTITUTE SHEET

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US88/00408

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ¹ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. 4 A61K 9/66, 37/22; B01J 13/02. U.S.Cl. 264/4.1, 4.3; 424/450; 438/829.		
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ⁴ Classification System Classification Symbols U.S.Cl. 264/4.1, 4.3; 424/450; 436/829.		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁴		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁸	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X Y	US, A, 4,229,360 PUBLISHED 21 OCTOBER 1980, (SCHNEIDER ET AL.) SEE ABSTRACT, COL. 1, LINES 19-23 AND 42-65, COL. 2, LINES 11-28; AND EXAMPLES 1 AND 2.	1,3-5,8-10 12, 13, 15-18 2,6,7,11,14
Y	US, A, 4,275,088 PUBLISHED 23 JUNE 1981, (HART2 ET AL.) SEE COL. 6, LINES 23-65	
Y	US, A 4,515,736 PUBLISHED 07 MAY 1985 (DEAMER) SEE COL. 3, LINES 8-40.	6,7
Y	JP, A, 0046921 PUBLISHED 17 MARCH 1982, (GREEN CROSS CORP.) SEE ABSTRACT.	11,14
<p>⁸ Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹ 26 APRIL 1988		Date of Mailing of this International Search Report ² 16 MAY 1988
International Searching Authority ³ ISA/US		Signature of Authorized Officer ¹⁹  RICHARD D. LOVERING